

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-508837

(P2002-508837A)

(43) 公表日 平成14年3月19日 (2002.3.19)

(51) Int.Cl.*

G 0 1 N 21/64
21/01

識別記号

F I

テマコード (参考)

G 0 1 N 21/64
21/01

F
B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願平10-550336
(86) (22) 出願日 平成10年1月29日 (1998.1.29)
(85) 翻訳文提出日 平成11年11月22日 (1999.11.22)
(86) 国際出願番号 PCT/US 98/01958
(87) 國際公開番号 WO 98/53304
(87) 國際公開日 平成10年11月26日 (1998.11.26)
(31) 優先権主張番号 08/864, 363
(32) 優先日 平成9年5月23日 (1997.5.23)
(33) 優先権主張国 米国 (U.S)
(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), JP

(71) 出願人 モレキュラー・ダイナミックス・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国、94086-4520 カリフォルニア州、サンノゼ、イースト・アーケース・アベニュー、928
(72) 発明者 カイン、ロバート・シイ
アメリカ合衆国、95014 カリフォルニア州、クバーティノ、メルセデス・ロード、22790
(74) 代理人 弁理士 深見 久郎 (外5名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光の検出性を強化するための光学的基板

(57) 【要約】

蛍光結像システム (図1) において使用するための試料基板 (51、図4A) は、典型的には金属の、鏡面反射する面を有する剛性ベースを含み、その上に透明なコーティング層 (53) が堆積される。該コーティング層は、試料材料内に求められる特定の蛍光組成物に対応する特定の蛍光励起波長が、コーティング層の上部からベース内の反射面までの間に実質的に四分の一の波長の奇数倍である光経路を有するように、その厚さが選択され、それにより、基板に入射する光の蛍光励起波長の定常波の波腹 (61) が、試料材料がコーティング層の上部においてそこに配置されるであろう場所またはその近辺に位置付けられるようになる。反射面上の試料の蛍光励起は、これにより最大にされる。透明なコーティング層は、誘電体材料 (シリカ等) から作られてもよく、あるいは、特定の試料組成物と結合するよう生物学的に活性な材料を最上部層に有する複数層で作られてもよい。

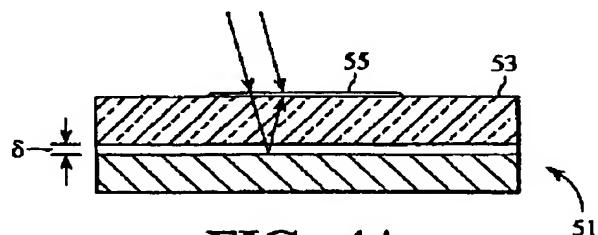


FIG. 4A

【特許請求の範囲】

1. 特定の蛍光励起波長とともに使用するよう適合される試料基板であって、
ほぼ平らな、滑らかな、鏡面反射する面を有する剛性ベースと、
前記ベースの前記反射面上に堆積される透明なコーティング層とを含み、前記
コーティング層は、光の特定の蛍光励起波長に対して、前記コーティング層の上
部から前記ベース内の該反射面までの光経路が前記光の四分の一の波長の奇数倍
となるように選択される厚さを有し、
よって、前記コーティング層の上部に配置される蛍光試料材料はいずれも、前
記基板上に入射する前記特定の蛍光励起光の定常波の波腹付近に位置付けられる
ようにされる、試料基板。
2. 前記コーティング層の厚さは、前記励起光の垂直な入射に対して選択される
、請求項1に記載の基板。
3. 前記光経路は、前記光の実質的に四分の一の波長である、請求項1に記載の
基板。
4. 前記ベースは金属で作られる、請求項1に記載の基板。
5. 前記ベースは、上部金属コーティングを有する剛性の底部層で作られる、請
求項1に記載の基板。
6. 前記反射面は、アルミニウム、銀、金およびロジウムからなる群より選択さ
れる金属である、請求項1に記載の基板。
7. 前記反射面は、その上に表面酸化物層を有する、請求項1に記載の基板。
8. 前記コーティング層は、誘電体材料からなる、請求項1に記載の基板。
9. 前記コーティング層は、シリカ、アルミナおよびフッ化材料からなる群より
選択される誘電体である、請求項8に記載の基板。
10. 前記コーティング層は複数層を含み、前記複数層の最上部層は、特定の試
料組成物と結合するよう生物学的に活性である、請求項8に記載の基板。
11. 蛍光結像システムであって、
その上面に蛍光試料材料を含むための試料基板と、
前記試料基板上の前記試料材料に向けられる光を提供する光源とを含み、前記
光は、前記試料材料の特定の蛍光組成物に特定的な蛍光励起波長を含み、さらに

前記特定の蛍光組成物を含む前記試料材料によって放出される蛍光を集めかつ検出するための検出手段を含み、

前記試料基板は、ほぼ平らで滑らかな鏡面反射する面を有する剛性ベースと、前記ベースの前記反射面上に堆積される透明なコーティング層とを含み、前記コーティング層は、前記コーティング層の上部から前記ベース内の該反射面までの光経路が、前記蛍光励起波長の四分の一の奇数倍となるよう選択される厚さを有し、

よって、前記特定の蛍光組成物を含みかつ前記コーティング層の前記上面に配置される試料材料はいずれも、前記基板上に入射する前記特定の蛍光励起光の波長の定常波の波腹の近くに位置付けられるようにされる、蛍光結像システム。

12. 前記光源は、前記試料基板上に垂直に入射するよう向けられる光を提供する、請求項11に記載のシステム。

13. 前記光経路は、前記光の実質的に四分の一の波長である、請求項11に記載のシステム。

14. 前記ベースは金属で作られる、請求項11に記載の基板。

15. 前記ベースは、上部金属コーティングを有する剛性の底部層で作られる、請求項11に記載の基板。

16. 前記反射面は、アルミニウム、銀、金およびロジウムからなる群より選択される金属である、請求項11に記載の基板。

17. 前記反射面は、その上に表面酸化物層を有する、請求項11に記載の基板。

18. 前記コーティング層は、誘電体材料で作られる、請求項11に記載の基板。

19. 前記コーティング層は、シリカ、アルミナおよびフッ化材料からなる群より選択される誘電体である、請求項18に記載の基板。

20. 前記コーティング層は複数層を含み、前記複数層の最上部層は、特定の生物学的試料組成物と結合するよう化学反応性である、請求項18に記載の基板。

21. 特定の蛍光組成物を含む試料材料の結像方法であって、

試料基板上に試料材料を配置するステップと、

前記試料材料内へと特定の蛍光組成物に特定的な蛍光励起波長を含む光を向けるステップとを含み、前記光はそれにより、前記特定の蛍光組成物が存在する場

合には必ず、前記試料材料による蛍光放出を誘導し、さらに

前記試料材料から放出された蛍光を集めかつ検出するステップを含み、

前記試料基板は、ほぼ平らで滑らかな鏡面反射する面を有する剛性ベースと、前記ベースの前記反射面上に堆積される透明なコーティング層とを含み、前記コーティング層は、前記コーティング層の上部から前記ベース内の該反射面までの光経路が前記蛍光励起波長の四分の一の奇数倍となるように選択される厚さを有し、

よって、前記特定の蛍光組成物を含みかつ前記コーティング層の前記上面に配置される試料材料はいずれも、前記基板上に入射する前記特定の蛍光励起光の波長の定常波の波腹の近くに位置付けられるようにされる、方法。

22. 蛍光結像システムであって、

その上面に蛍光試料材料を含むための試料基板と、

前記試料基板上の前記試料材料に向けられる光を提供する少なくとも1つの光源とを含み、各前記光源からの前記光は、前記試料材料の特定の蛍光組成物に特定的な蛍光励起波長を含み、それにより、光の異なる波長が前記試料材料内の異なる組成物から蛍光を励起できるようにされ、さらに

前記試料材料の複数の異なる蛍光組成物を含む前記試料材料によって放出される蛍光を集めかつ検出するための検出手段を含み、

前記試料基板は、ほぼ滑らかな鏡面反射する面を有する剛性ベースと、前記ベースの前記反射面上に堆積される透明なコーティング層とを含み、前記コーティング層は、前記コーティング層の上部から前記ベースの反射面までの光経路が前記少なくとも1つの光源からの各蛍光励起波長の光に対して四分の一の波長のほぼ奇数倍となるように選択される厚さを有する、蛍光結像システム。

23. 前記試料基板を傾斜させて前記少なくとも1つの光源からの光の入射角を変化させるための試料基板支持および励起手段をさらに含み、それにより、各選択された蛍光励起波長に対して、前記基板の傾斜角がやはり、前記光経路がその

選択された波長の四分の一の奇数倍に実質的に等しくなるように選択されるよう
にされる、請求項22に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

蛍光の検出性を強化するための光学的基板

技術分野

本発明は、標識を付けた分子生物学の標本等の蛍光、燐光または発光試料材料を、検査、表示、分析または識別するのに使用される、プレート、スライドおよび細胞等の試料基板に関し、より特定的には、その光学的な構造が蛍光検出および結像を強化するよう適合される、上述のような試料のホルダに関する。

背景技術

蛍光顕微鏡法は、分子生物学、生化学、および他の生命科学の分野において、蛍光プローブで標識を付けられるかまたはラベルを付けられた核酸（DNA、RNA）およびタンパク質（酵素、抗原等）を含む生物学的分子を分析するために、しばしば使用される。このような使用例に、遺伝子検出等のためのDNA診断がある。DNA診断においては、DNA試料がガラス基板上に堆積され、基板表面に存在するアミノシラン等の化学結合剤、および、カルボジイミド蒸気等の試薬によって、基板に結合される。基板に結合されたDNAはその後、蛍光によって結像することが可能となる。試料の蛍光は、もともとは、従来の顕微鏡によって視覚的に評価されていたが、このような手動による方法は時間もかかりコストも高くつくことがわかった。今では、種々の高速の自動蛍光結像システムが入手可能である。

蛍光検出および測定機器の重要な利点は、その感度である。これは主に、その機器の光学的結像システムの信号対雑音比（S/N）によって決定される。優れた設計による結合システムは、その内部の雑音源によってではなくその集光能力によって制限される信号対雑音比を有する。このようなシステムの理論的なS/Nは、光電子増倍管（PMT）を使用する場合の陰極における光電子の数によって表わされ、この数は実質的に、試料基板上の対象となる領域から検出器に到達するフォトンの数、検出器の量子効率、および、検出器によって生成される暗電子の数、に依存する。

$$S/N = S / [S + 2B]^{1/2}$$

式中、Bはバックグラウンドノイズの合計、Sは測定された信号からBを減じたものである。S/Nを増して感度を高める試みとして自明なのは、バックグラウンドノイズを減じることである。バックグラウンドノイズ源としては、試料からの蛍光を誘導するレーザ光の鏡面反射または拡散反射、試料を保持する基板の自己蛍光(autofluorescence)、光学結像システムの光経路内の光学機器からの自己蛍光、迷光、および検出器の暗電流、がある。検出器に到達する迷光は、結像システムの開口を的確にサイズ決めしつつ正しく位置付けることによって、大いに減じることが可能である。システムにおいて二色フィルタおよび他の分光フィルタならびにビームスプリッタを使用することによって、蛍光は通過させながら、迷光および、反射レーザ光の大半を、排除することが可能である。光学素子の自己蛍光は、可能な限り重合体レンズに代えてガラスレンズを、また、レンズに代えて湾曲した鏡を使用することで、光経路内でのレンズの接合剤(cement)の使用を避けることによって、減じることが可能である。基板の自己蛍光は、極薄または不透明なガラス基板等の低蛍光材料を使用することによって、減じることが可能である。たとえば、米国特許番号第5,095,213号において、Stronginは、プラスチックにある量の黒炭粒(black carbon powder)を加えて不透明にかつ実質的に非蛍光にしたプラスチックスライドを開示している。自己蛍光に対処する別の方法は、パルス状のまたは変調された励起を使用すること、および、バックグラウンドの蛍光と標本の蛍光との発光減衰率の差を利用することであり、これらは、Dandiker等への米国特許番号第4,877,965号およびCreager等への第5,091,653号に開示されている。

米国特許番号第5,552,272号において、Bogartは、対象となる検体(analyte)の存在またはその量を検出するための検定システムおよび方法を開示している。これは、テスト基板上に付与される試料内に検体が存在する場合と存在しない場合との間の色のコントラスト、すなわち表面からの光の観察される波長(または波長の組合せ)の差を増強する、光学的に活性な表面を有するテスト基板を含む。特定的には、この基板は、シリコンウェハまたは金属(アルミニウム等)のベース等の、反射する固体の(solid)光学的支持部に、光学的薄膜がコーティングされたものであり得る。コーティングは、複数層であってもよく、

たとえば、支持部の上面上の接着層、および、接着層の上面上に設けられた、対象となる検体に対する特定の結合相手を含む受容層、を含み得る。コーティング全体の厚さは、入射光が反射時に薄膜の干渉を受けて特定の色が生み出されるよう、選択される。特定的には、コーティングの材料は、減衰されるべき不所望な色の四分の一波に相当する厚さ合計を必要とし、それにより、その色を破壊するような干渉が起きるようにされねばならない。したがって、基板は特定の背景色を有し、この背景色は、対象となる検体が存在する場合に観察される異なる色に対する、比較基準として使用することができる。視覚による質的な分析および機器による量的な測定が示唆される。楕円偏光計を使用した偏光の対比もまた示唆される。

Bogartの発明を、上述の特許の譲受人であるコロラド州ブルダー (Boulder, Colorado) のBiostar, Inc. が使用している1例に、患者から取られた試料内における感染性病原体の特定の抗原の存在を（30分以内に）高速で検出するための、光学的免疫測定（OIA）診断用スクリーニングテストがある。市販の製品としては、AグループおよびBグループの連鎖球菌のための、および、クラミジアトラコーマのためのテストキットがある。これらの特定的な検定法は、Bogartの特許内で例として挙げられており、対応のBiostarの製品のパッケージに挿入された説明書にも、また、医学雑誌にも論文として多数、掲載されている。要約すれば、それらはすべて、テスト基板表面上の分子の薄膜コーティングの光学的厚さが物理的に変化することに起因する、テスト基板からの光の反射の色変化を視覚的に直接検出することに依存している。このようなコーティングの光学的厚さの変化は、テスト表面上に固定された抗体と、テスト表面に与えられる試料液の1滴の中に存在し得る特定の抗原との結合反応によって引起される。もともとのむき出しのテスト表面は、膜厚が薄く、そのため、白色光が表面から反射するとき、視覚的にはバックグラウンドの金色が優勢となる。付与される試料内に対象となる特定の抗原が存在すると、抗原と抗体との結合反応が生じて薄膜の厚さが増す結果となり、したがって、テスト表面の色が金色から紫色に変化する。反対に、抗原が試料内に存在しない場合には、結合反応は起こらず、もともとの薄膜の厚さも変ることはなく、テスト表面の色はもともとの金色のままであって

否定的な結果を示す。この診断用検定道具は、非常に感度が高く、解釈も容易である。

Bogartはさらに、彼の発明に関する別の実施例において（上述の特許の図17）、これらの基板を蛍光検出の強化に使用することを開示している。対象となる検体が基板コーティングの受容層内の特定の結合相手と反応することによって基板表面に結合された後に、蛍光ラベル分子を検体に付着させることが可能である。より特定的には、蛍光分子は、二次抗体等の、好適な、選択的かつ特異的受容性材料または試薬に付着させて、基板表面に付与することができる。蛍光ラベルはしたがって、表面上に対象となる検体がもし存在すればそれに結合され、検体架橋を介して表面に固定される。励起波長の光を表面に当てることにより、表面に結合されているラベルの蛍光が誘導され、それにより、対象となる検体の存在が明らかにされる。最大蛍光波長を、区別されるべき励起波長と十分に離すことができないことも考えられるため、反射基板に、励起波長の反射を抑えて検出器に達するバックグラウンドノイズを減じるように厚さが選択された、反射防止層を設けることも可能である。Bogartは、蛍光信号の生成は膜厚に依存しない、と主張している。

バックグラウンドノイズが最小に抑えられたとしても、（かつ、反射または蛍光試料信号が基板のバックグラウンドから対比によってより鮮明に際立つように基板が形成されたとしても）、可能な最大の信号対雑音比（ S/N_{max} ）はやはり、 $S/N_{max} = S^{1/2}$ に制限される。レーザの出力を増すことによって、蛍光信号Sは増大するであろうが、反射レーザノイズもまた増大し、結果として得られるS/Nにはほとんど改善が認められないことが考えられる。

本発明の目的は、試料の励起および蛍光放出が増大された、改善された試料基板を提供することである。

発明の開示

この目的は、以下のような反射性試料基板によって達成することができる。すなわち、透明なコーティング層をその上に有する試料基板であって、そのコーテ

ィング層の厚さが、該コーティング層の上に配置された分子試料が励起光の波腹

に確実に位置付けられるように選択されている、反射性試料基板である。特定的には、この基板は、鏡面反射する上面を有する剛性ベースを含む。ベースの上面上の透明なコーティングは、光の特定の励起波長が直角に入射するときに、コーティングの上部からベースの反射面までの光経路が、励起光の四分の一波長の実質的に奇数倍（1、3、5等）となるように、その厚さが選択されている。材料の光経路の長さは、光の波長、材料の屈折率、および、材料を通じる伝搬の角度によって規定される。なお、ベースの反射面は、その物理的な表面よりも、反射面の材料の被膜（または透過）深さおよび、ベース上の表面酸化物の光学的深さの合計に等しい量だけ、実際にはわずかに下方にあることに留意されたい。励起波長の線幅は、狭い方が好ましい。

ベースは、完全に金属で作ってもよいが、上面に金属のコーティングを施した剛性の底層で作られてもよい。この場合、金属としては、アルミニウム、銀、金またはロジウムが使用され得る。透明なコーティングは、シリカ、アルミナ、またはフッ化物材料（ MgF_2 等）といった、誘電体材料の単一層であってもよいが、代替的に、最上部層が特定の生物学的試料組成物をそれに結合するための化学反応性材料からなる、多層コーティングであってもよい。

試料をコーティング層上の、励起光の波腹上にまたはその近辺に配置することによって、最大の蛍光励起が得られる。反射性基板は、蛍光結像顕微鏡システムの集光の立体角をほぼ倍増することによって、蛍光の集光もまた強化する。したがって、蛍光信号の合計が増し、信号対雑音比が大いに改善される。また、コーティング層は非常に薄いため、その材料からの蛍光バックグラウンドノイズは減じられる。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の基板とともに使用するための、蛍光顕微鏡システムの概略的な側面図である。

図2は、図1の顕微鏡のような蛍光結像システムとともに使用される、本発明の試料基板の概略的な斜視図である。

図3Aおよび図4Aは、2つの試料基板の拡大側面図であって、一方は、透明

なコーティングを有さず（図3A）、他方は、本発明にしたがって、透明なコーティング層を有する（図4A）、基板である。

図3Bおよび図4Bはそれぞれ、図3Aおよび図4Aの基板について、深さに対する電界強度|E|を示すグラフであって、図4Aの本発明による基板の利点を説明する図である。

発明を実施するためのベストモード

本発明の試料基板は、多種多様な可能な蛍光顕微鏡システムのいずれにおいても使用することが可能である。このようなシステムにはたとえば、Sawamura等への米国特許番号第4, 284, 897号、Mathies等への第5, 091, 652号、Kumagaiへの第5, 296, 700号、Dixon等への第5, 381, 224号、およびNoguchiへの第5, 504, 336号、ならびに、本発明の譲受人に譲渡された米国特許出願番号第08/595, 355号、第08/616, 174号、および第08/791, 684号、がある。本発明とともに使用される好ましい蛍光結像システムの1例を図1に示す。

レーザ等の光源18は、光ビーム19を生成する。このビームは、好ましくは、単色性のコヒーレント光のコリメートされたビームである。しかし、発光ダイオード（LED）等のノンコヒーレントな光源を使用することも可能であり、また、コリメートされていない光源をコリメート用光学機器に結合してコリメートされたビームを生成することも可能である。ビーム19が単色性でない場合には、ビーム19をフィルタ20に通して、不所望な波長を減じることも可能である。

ビーム19はその後、ビーム拡大器21を通されて、ビームスプリッタ23によって走査装置25上に反射される。二次元の走査を行なうものであれば、どのような走査機構も使用することができる。たとえば、走査器25は、検流計の鏡または回転する多角形等の、第1の軸Aを中心に旋回または回転可能であってモータ45によって動かされる、第1のビーム反射部材43と、第1の軸Aと直交する第2の軸Bを中心にステッパモータ49によって回転させられ、かつ、その

上に第1の反射部材43が支持される、可動プラットホームまたはターンテーブル47と、を有し得る。反射器43は、平らな反射面を有する必要はなく、一方

または両方の軸で凹状または凸状であってもよく、また、回折面を有してもよい。

走査ビームは、対物レンズ27を通されて、試料29上のスポット、線または領域を照射する。対物レンズ27は好ましくは、画像平面においてテレセントリック（またはほぼテレセントリック）であって、走査位置にかかわらず、ビームの主要光線が常に、試料表面に実質的に直角に入射するようにされる。入射ビームに関して、対物レンズの焦点面は試料29のすぐ近くにあるべきである。対物レンズ27は、同軸の照射および集光を可能にする。集光効率を最大にするために、対物レンズ27は、大きな数値の開口を有することが好ましい。対物レンズ27は好ましくは、反射面43において走査軸AおよびBと一致する外部瞳孔を有して、集められた光が、逆進するビーム(retro-beam)としてビームスプリッタ23に戻るようにされる。照射用の光ビーム19は、照射スポットにおいて試料29からの蛍光放出を誘導する、励起ビームである。蛍光はその後、コンデンサとして作用する対物レンズ27によって集められて、逆進ビームとして、入射光経路に沿って（ただし逆方向に）戻される。蛍光は通常、誘導用の入射ビームの波長とは異なる、広帯域の波長からなるため、また、システムは多様な蛍光色素を処理するよう設計されねばならないため、対物レンズ27を含むシステムは、好ましくはほぼ色消し(achromatic)であって、ある範囲の波長にわたって色収差が補正されたものである。

逆進ビーム31は、空間フィルタまたはストップ32の開口または瞳孔および、ビームスプリッタ23を通過し得る。ビームスプリッタ23は、二色フィルタとして作用してもよく、この場合、入射ビーム波長を反射して、蛍光波長を伝達すること（またはその逆）が可能である。この他にも、ビームスプリッタ23は、入射ビーム19と逆進ビーム31の光を分けることのできるものであれば、他のどのような種類のビームスプリッタであってもよい（たとえば、四分の一波長板と組合せた偏光感光ビームスプリッタ）。逆進ビーム31はその後、バンドパ

スフィルタ34および集束レンズ33を介して、制限開口35へと通過し得る。開口35を通過する光は、光電子増倍管（PMT）等の光検出器39上に当たる。

どのような結像システムが使用される場合にも、そのシステムは、広い走査フィールドにわたって高速で、高解像度の結像および最小の光学的収差で、走査が

可能であることが好ましく、高い集光効率で同軸の照射および集光ができるべきである。色補正に優れた色消しシステム、および、（自己蛍光を含む）バックグラウンドノイズを最小にするよう設計されたシステムが好ましい。

図2を参照して、本発明の試料基板51は、その上面53上に、蛍光試料55を有する。基板51は、図1に示すような、どのような蛍光結像システムとも協働するように設計されている。このようなシステムを、表面53上の試料55に対物レンズ61を通じて向けられる波長 λ_1 の蛍光誘導ビーム59を発するレーザ光ビーム57とともに、図2に概略的に示す。試料55は、波長 λ_2 の蛍光を放出し、これが、対物レンズ61によって集められ、ビームスプリッタ63によって入射光とは分けられて、PMT検出器65へと送られる。改善された基板51は、レーザビーム59の出力を増す必要なく、また、システム内の、基板51自体以外の対物レンズ61やその他の光学機器を変更する必要なく、蛍光の放出および集光を最大にするように作られている。

図3A、図3B、および図4A、図4Bを参照して、とられる試みは、蛍光試料55がその上に配置される基板を鏡面化することである。幾何光学または「光線」光学的な見地からは、このような試みによって、入射光による励起が倍増されるであろう（なぜなら、その場合、光線は試料を直接および反射時に照射すると思われるため）、また、放出される蛍光の集光もやはり倍増するであろう（なぜなら、対物レンズから放出される蛍光光線が反射によって対物レンズに戻されて、集光の立体角が有效地に倍増されると思われるため）、と推論されるであろう。しかし、この試み自体はうまくいかないことがわかっている。図3Aに見られるような、剥き出しの反射基板51'が使用される場合には、遠いフィールドにおいて観察される反射性は予測通り増大するものの、試料55は実際にはほんの

わずかしか励起されず、蛍光はもしあつとしてもほんのわずかしか観察されないものである。

この予測できなかつた現象を理解するために、我々は物理光学と光の波動理論とを組合せねばならない。1890年にO. Wienerは、彼の実験によって、磨いた鏡から直角に入射する反射光によって定常波が生成されたことを報告した。鏡の表面に対して斜めに薄い感光フィルムを配置し、その後、露光したフィルムを

現像することによって、フィルム上に、分離した暗帯が生成された。傾斜角を減じると、それらの帯の間隔はさらに広がつた。この実験は、2年後に、P. DrudeおよびW. Nernstによって繰返されたが、この時は、蛍光を使用して、感光紙の現像を必要とせずに直接その現象が観察された。この現象は、入射光波と反射光波とが重ね合せられた結果、鏡面の上方に異なる高さの節および波腹を有する定常波が生成されたものと理解される。節は、反射面（これは、実際の金属の導電性に限界があるために、実際には物理的な表面のわずかに下方である）に位置付けられ、節同士は、二分の一波長の距離だけ間隔がおかれている。

剥き出しの鏡面上で分子試料の蛍光を発生させようと試みる際にこの現象が引起す問題は、試料材料が励起光の定常波における節の近くに位置付けられているためにわずかな励起しか起こらない、ということである。図3Aからわかるように、分子試料55は、剥き出しの金属基板51'の物理面53'の上に位置する。反射面は、金属基板51'の被膜深さと通常の表面酸化物の深さとの合計に対応する距離 σ だけ、物理面53'よりわずかに下方にある。アルミニウムの基板の場合、被膜深さは約13nmの厚さであり、表面酸化物の厚さは約2~5.5nmであり、距離 σ は約16.5nmとなる。532nmの波長を有する入射光の場合、この距離 σ は波長の約4%となる。図3Bに示すように、電界の振幅（光にとって、電界は主要な関心事の一つである）は、分子試料の場所63においてほぼゼロである。なぜなら、これは、反射によって発せられる定常波の節に近いためである。最高でも、試料に見られる電界振幅は、波腹の場所における最大振幅の約23%に留まる。（強度は、振幅の二乗であるが、これは最大のわずか5%にすぎない）。この試料は、反射面の上方に位置付けられているにもかかわ

らず、ほとんど励起されず、その結果、蛍光をほとんど発しない。

次に図4Aを参照して、本発明の試料基板51は、適切な厚さの透明なコーティング53を反射ベース上に付加することによって、分子試料を励起光の定常波の波腹にまたはその近辺に位置付ける基板51を作ることができ、それにより、励起および結果として得られる蛍光放出を大いに増大させることができる、という認識によって、この問題を解決するものである。基板51上のコーティング53は、試料とコーティングの界面から反射ベース内の被膜深さまでの光経路の長

さが実質的に四分の一波長に等しくなるようにされねばならない。

適切なコーティング厚さを正しく決定するためには、励起光の入射角と、コーティング材料および反射ベースの表面酸化物の屈折率とを、考慮に入れねばならない。垂直な入射の場合、光経路の長さ(OPL)は、被膜深さ、有効な酸化物厚さおよび有効なコーティング厚さの合計に等しい。アルミニウムベースの場合、被膜深さは約13.1nmである。アルミニウム酸化物は、厚さが約3.5nmであり、約6.2nmの有効な光学的厚さに対しては、532nm波長で約1.772の屈折率を有する。532nmのレーザ励起光の場合、四分の一波長は1333nmである。したがって、コーティングは、114nmの有効な光学的厚さを有さねばならない。シリカコーティング53を選択する場合、532nm波長では屈折率が1.547であるため、約73.5nmのコーティング厚さが必要となる。異なる波長の光、異なる反射ベース材料もしくは透明コーティング材料、または異なる入射角とともに、異なる励起源を使用する場合には、コーティングの厚さも変化するが、その場合もやはり、コーティング厚さは、四分の一波長の光学的厚さ(またはその奇数倍)が得られるように計算されねばならない。

図4Bに示すように、適切なコーティング厚さが与えられた場合、試料材料55は、励起光の定常波の波腹にまたはその付近に、すなわち、電界振幅(および強度)がピークにある位置61の近くに、位置付けられることになる。この場合、励起が最大なので、最大の蛍光が発せられる。コーティング厚さが励起波長に対して厳密に正しくない場合でも、強度がピーク強度の90%または95%であっても、蛍光信号はやはり、先行技術による試料基板の場合よりもはるかに改善

されるであろう。理想的な厚さからのばらつきは、被膜深さがはっきりわからぬこと、コーティング前のベースの金属酸化物に試料間でばらつきがあること、および、コーティングにばらつきがあること、によって起こり得る。さらに、2またはそれ以上の異なる波長が同じ基板とともに使用される場合、それらすべての波長に対して十分であるが、おそらくはそのどれ一つに対しても理想的ではない、妥協的な厚さが選ばれ得る。すなわち、図1の蛍光結像システムは、異なる蛍光試料組成物に対して同時にまたは選択的に多数の蛍光励起波長を提供する、1または複数の光源を有する場合があり、試料基板の公称の光学的厚さは、それら異

なる励起波長の各々に対してほぼ四分の一の波長（またはその奇数倍）となるよう選択され得る。さらに、試料基板を傾いた支持部上に装着して傾斜角または配向を変化させることによって、異なる波長から選択された1つの波長に対してその光経路が四分の一波長という条件に実質的に合致するように光の入射角を選択することができるようになることも可能である。この場合、異なる波長が選択されるたびに、それに従って基板を再配向することができる。

ベースの金属は、アルミニウム、銀、金、ロジウム等を含み得る。これは、ガラスのスライドまたは他の剛性の底層上に設けられた、反射するコーティング層であってもよい。透明なコーティングは、シリカ (SiO_2)、アルミナ (Al_2O_3)、フッ化マグネシウム (MgF_2)、または他の何らかの誘電体であってもよい。これはまた、多層であってもよい。この層、または最上部層は、必ずしも不活性な材料でなくともよく、試料材料または試料の特定の組成物と結合するよう、生物学的に活性であってもよい。

【図1】

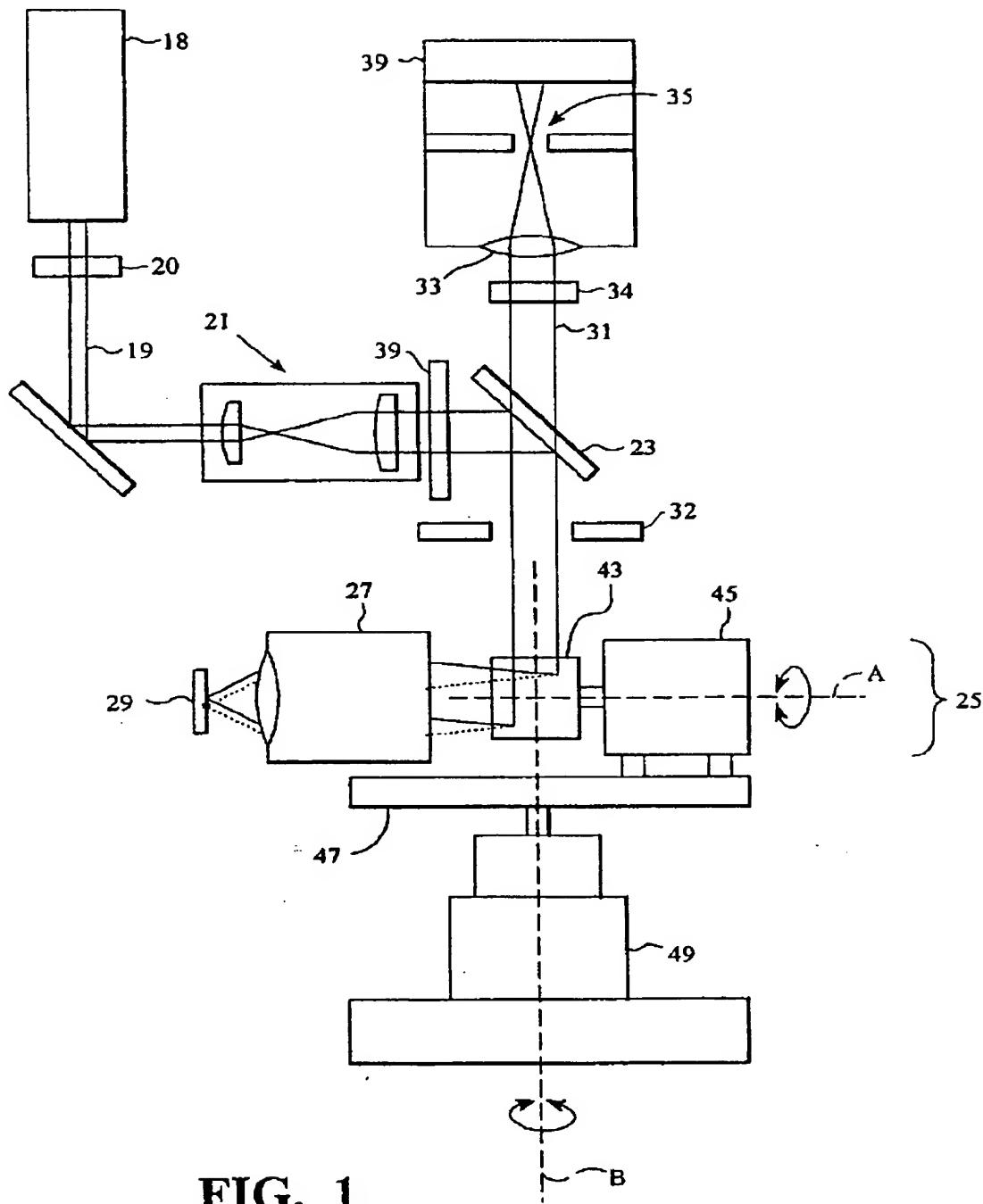


FIG. 1

【図2】

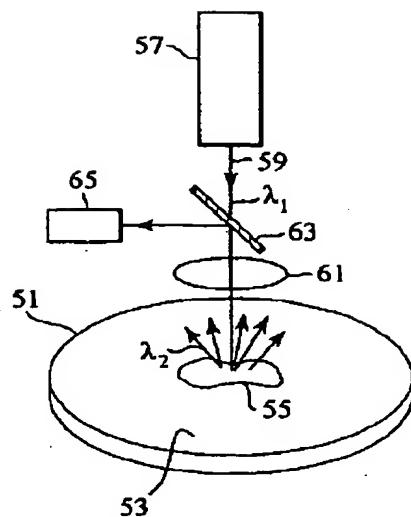


FIG. 2

【図3】

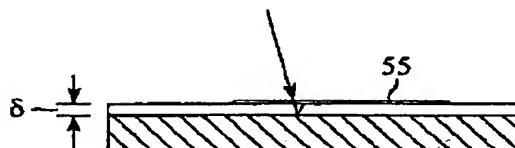


FIG. 3A

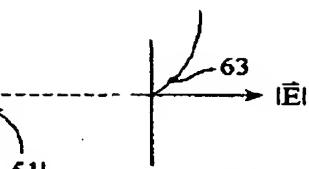


FIG. 3B

【図4A】

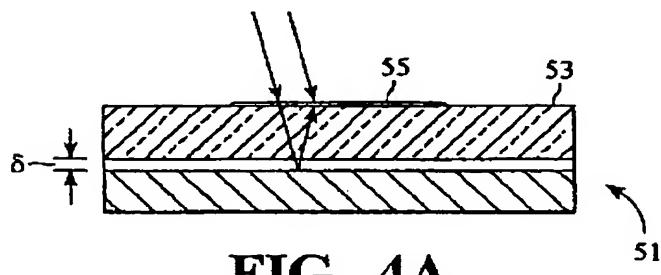


FIG. 4A

【図4】

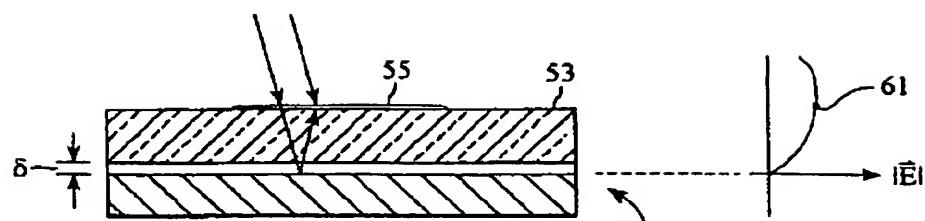


FIG. 4A

FIG. 4B

【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】平成11年4月9日(1999.4.9)

【補正内容】

の波長とは異なる、広帯域の波長からなるため、また、システムは多様な蛍光色素を処理するよう設計されねばならないため、対物レンズ27を含むシステムは、好ましくはほぼ色消し(achromatic)であって、ある範囲の波長にわたって色収差が補正されたものである。

逆進ビーム31は、空間フィルタまたはストップ32の開口または瞳孔および、ビームスプリッタ23を通過し得る。ビームスプリッタ23は、二色フィルタとして作用してもよく、この場合、入射ビーム波長を反射して、蛍光波長を伝達すること(またはその逆)が可能である。この他にも、ビームスプリッタ23は、入射ビーム19と逆進ビーム31の光を分けることのできるものであれば、他のどのような種類のビームスプリッタであってもよい(たとえば、四分の一波長板と組合せた偏光感光ビームスプリッタ)。逆進ビーム31はその後、バンドパスフィルタ34および集束レンズ33を介して、制限開口35へと通過し得る。開口35を通過する光は、光電子増倍管(PMT)等の光検出器39上に当たる。

どのような結像システムが使用される場合にも、そのシステムは、広い走査フィールドにわたって高速で、高解像度の結像および最小の光学的収差で、走査が可能であることが好ましく、高い集光効率で同軸の照射および集光ができるべきである。色補正に優れた色消しシステム、および、(自己蛍光を含む)バックグラウンドノイズを最小にするよう設計されたシステムが好ましい。

図2を参照して、本発明の試料基板51は、その上面53上に、蛍光試料55を有する。1実施例における基板51は、線54に沿って傾斜するよう装着することができる。基板51の傾斜角は、以下に説明するように選択可能である。基板51は、図1に示すような、どのような蛍光結像システムとも協働するように設計されている。このようなシステムを、表面53上の試料55に対物レンズ61を通じて向けられる波長 λ_1 の蛍光誘導ビーム59を発するレーザ光ビーム57とともに、図2に概略的に示す。試料55は、波長 λ_2 の蛍光を放出し、これ

が、対物レンズ61によって集められ、ビームスプリッタ63によって入射光とは分けられて、PMT検出器65へと送られる。改善された基板51は、レーザビーム59の出力を増す必要なく、また、システム内の、基板51自体以外の対物レンズ61やその他の光学機器を変更する必要なく、蛍光の放出および集光を最大にするように作られている。

図3A、図3B、および図4A、図4Bを参照して、とられる試みは、蛍光試料55がその上に配置される基板を鏡面化することである。幾何光学または「光線」光学的な見地からは、このような試みによって、入射光による励起が倍増されるであろう（なぜなら、その場合、光線は試料を直接および反射時に照射すると思われるため）、また、放出される蛍光の集光もやはり倍増するであろう（なぜなら、対物レンズから放出される蛍光光線が反射によって対物レンズに戻されて、集光の立体角が有效地に倍増されると思われるため）、と推論されるであろう。しかし、この試み自体はうまくいかないことがわかっている。図3Aに見られるような、剥き出しの反射基板51'が使用される場合には、遠いフィールドにおいて観察される反射性は予測通り増大するものの、試料55は実際にはほんのわずかしか励起されず、蛍光はもしかしてほんのわずかしか観察されないのである。

この予測できなかった現象を理解するために、我々は物理光学と光の波動理論とを組合せねばならない。1890年にO. Wienerは、彼の実験によって、磨いた鏡から直角に入射する反射光によって定常波が生成されたことを報告した。鏡の表面に対して斜めに薄い感光フィルムを配置し、その後、露光したフィルムを現像することによって、フィルム上に、分離した暗帯が生成された。傾斜角を減じると、それらの帯の間隔はさらに広がった。この実験は、2年後に、P. DrudeおよびW. Nernstによって繰返されたが、この時は、蛍光を使用して、感光紙の現像を必要とせずに直接その現象が観察された。この現象は、入射光波と反射光波とが重ね合せられた結果、鏡面の上方に異なる高さの節および波腹を有する定常波が生成されたものと理解される。節は、反射面（これは、実際の金属の導電性に限界があるために、実際には物理的な表面のわずかに下方である）に位置付

けられ、節同士は、二分の一波長の距離だけ間隔がおかれている。

剥き出しの鏡面上で分子試料の蛍光を発生させようと試みる際にこの現象が引き起す問題は、試料材料が励起光の定常波における節の近くに位置付けられているためにわずかな励起しか起こらない、ということである。図3 Aからわかるように、分子試料55は、剥き出しの金属基板51'の物理面53'の上に位置する。反射面は、金属基板51'の被膜深さと通常の表面酸化物の深さとの合計に対応する距離 σ だけ、物理面53'よりわずかに下方にある。アルミニウムの基板の

場合、被膜深さは約13nmの厚さであり、表面酸化物の厚さは約2~5.5nmであり、距離 σ は約16.5nmとなる。532nmの波長を有する入射光の場合、この距離 σ は波長の約4%となる。図3 Bに示すように、電界の振幅（光にとって、電界は主要な関心事の一つである）は、分子試料の場所63においてほぼゼロである。なぜなら、これは、反射によって発せられる定常波の節に近いためである。最高でも、試料に見られる電界振幅は、波腹の場所における最大振幅の約23%に留まる。（強度は、振幅の二乗であるが、これは最大のわずか5%にすぎない）。この試料は、反射面の上方に位置付けられているにもかかわらず、ほとんど励起されず、その結果、蛍光をほとんど発しない。

次に図4 Aを参照して、本発明の試料基板51は、適切な厚さの透明なコーティング53を反射ベース上に付加することによって、分子試料を励起光の定常波の波腹にまたはその近辺に位置付ける基板51を作ることができ、それにより、励起および結果として得られる蛍光放出を大いに増大させることができる、という認識によって、この問題を解決するものである。基板51上のコーティング53は、試料とコーティングの界面から反射ベース内の被膜深さまでの光経路の長さが実質的に四分の一波長に等しくなるようにされねばならない。

適切なコーティング厚さを正しく決定するためには、励起光の入射角と、コーティング材料および反射ベースの表面酸化物の屈折率とを、考慮に入れねばならない。垂直な入射の場合、光経路の長さ（OPL）は、被膜深さ、有効な酸化物厚さおよび有効なコーティング厚さの合計に等しい。アルミニウムベースの場合

、被膜深さは約13.1nmである。アルミニウム酸化物は、厚さが約3.5nmであり、約6.2nmの有効な光学的厚さに対しては、532nm波長で約1.772の屈折率を有する。532nmのレーザ励起光の場合、四分の一波長は133nmである。したがって、コーティングは、114nmの有効な光学的厚さを有さねばならない。シリカコーティング53を選択する場合、532nm波長では屈折率が1.547であるため、約73.5nmのコーティング厚さが必要となる。異なる波長の光、異なる反射ベース材料もしくは透明コーティング材料、または異なる入射角とともに、異なる励起源を使用する場合には、コーティングの厚さも変化するが、その場合もやはり、コーティング厚さは、四分の一波長の光学的厚さ（またはその奇数倍）が得られるように計算されねばならない。

図4Bに示すように、適切なコーティング厚さが与えられた場合、試料材料5は、励起光の定常波の波腹にまたはその付近に、すなわち、電界振幅（および強度）がピークにある位置61の近くに、位置付けられることになる。この場合、励起が最大なので、最大の蛍光が発せられる。コーティング厚さが励起波長に対して厳密に正しくない場合でも、強度がピーク強度の90%または95%であっても、蛍光信号はやはり、先行技術による試料基板の場合よりもはるかに改善されるであろう。理想的な厚さからのばらつきは、被膜深さがはっきりわからぬこと、コーティング前のベースの金属酸化物に試料間でばらつきがあること、および、コーティングにばらつきがあること、によって起こり得る。さらに、2またはそれ以上の異なる波長が同じ基板とともに使用される場合、それらすべての波長に対して十分であるが、おそらくはそのどれ一つに対しても理想的ではない、妥協的な厚さが選ばれ得る。すなわち、図1の蛍光結像システムは、異なる蛍光試料組成物に対して同時にまたは選択的に多数の蛍光励起波長を提供する、1または複数の光源を有する場合があり、試料基板の公称の光学的厚さは、それら異なる励起波長の各々に対してほぼ四分の一の波長（またはその奇数倍）となるように選択され得る。さらに、試料基板を傾いた支持部上に装着して傾斜角または配向を変化させることによって、異なる波長から選択された1つの波長に対してその光経路が四分の一波長という条件に実質的に合致するように光の入射角

を選択することができるようになると可能である。この場合、異なる波長が選択されるたびに、それに従って基板を再配向することができる。

ベースの金属は、アルミニウム、銀、金、ロジウム等を含み得る。これは、ガラスのスライドまたは他の剛性の底層上に設けられた、反射するコーティング層であってもよい。透明なコーティングは、シリカ (SiO_2)、アルミナ (Al_2O_3)、フッ化マグネシウム (MgF_2)、または他の何らかの誘電体であってもよい。これはまた、多層であってもよい。この層、または最上部層は、必ずしも不活性な材料でなくともよく、試料材料または試料の特定の組成物と結合するよう、生物学的に活性であってもよい。

【図2】

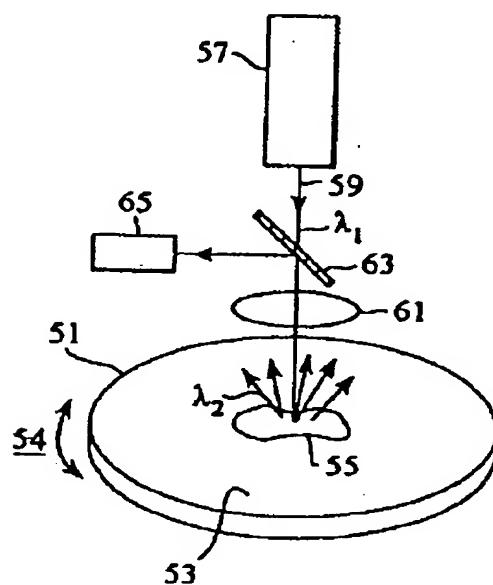


FIG. 2

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US98/01958
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : G01N 21/64 US CL : 250/458.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 250/458.1, 4612		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS antinode(p)fluorescein?		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,394,268 A (LANNI et al.) 28 FEBRUARY 1995 (28.02.95), col. 5, lines 51-54 and 58-63.	1, 2, 4-8, 11, 12, 14-18, 21, 22
A	US 3,591,805 A (SCHOEFFEL) 6 JULY 1971 (06.07.71).	1, 8-10
A	DE 43 01 005 A1 (DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GmbH) 21 JULY 1994 (21.07.94).	1, 8-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 16 MARCH 1998		Date of mailing of the international search report 22 APR 1998
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer CONSTANTINE HANNAHER /MC Jilly Telephone No. (703) 308-4850

フロントページの続き

(72)発明者 マラソン, エリック・ジイ
アメリカ合衆国、94114 カリフォルニア
州、サン・フランシスコ、ビィ・コーベッ
ト・アベニュー、477

(72)発明者 ジョンストン, リチャード・エフ
アメリカ合衆国、95247 カリフォルニア
州、マーフィス、マーフィス・キャンプ・
ロード、4551